

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19)世界知的所有権機関  
国際事務局(43)国際公開日  
2003年12月24日 (24.12.2003)

PCT

(10)国際公開番号  
WO 03/105578 A1(51)国際特許分類: A01K 67/027, G01N 33/50, 33/15,  
A61K 45/00, A61P 31/04, C12N 15/09, C12Q 1/02

(72)発明者: および

(75)発明者/出願人(米国についてのみ): 春良 静男  
(AKIRA,Shizuo) [JP/JP]; 〒569-0036 大阪府 高槻市 辻  
子一丁目 7 番 16 号 Osaka (JP).

(21)国際出願番号: PCT/JP02/12908

(74)代理人: 廣田 雅紀 (HIROTA,Masanori); 〒107-0052  
東京都 港区 赤坂二丁目 8 番 5 号若林ビル 3 階 Tokyo  
(JP).

(22)国際出願日: 2002年12月10日 (10.12.2002)

(81)指定国(国内): CA, US.

(25)国際出願の言語: 日本語

規則4.17に規定する申立て:

—すべての指定国のために不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て(規則4.17(v))

(26)国際公開の言語: 日本語

添付公開書類:

—国際調査報告書

(30)優先権データ:  
特願2002-173254 2002年6月13日 (13.06.2002) JP

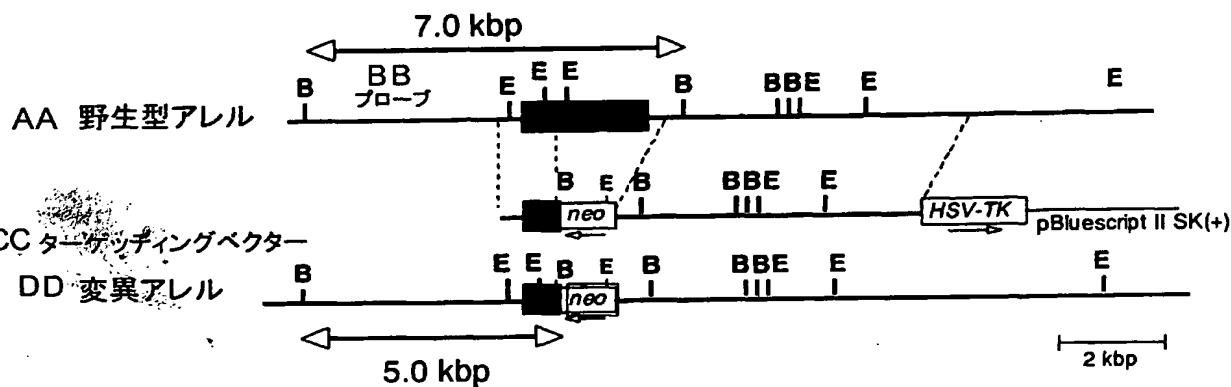
—不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て

(71)出願人(米国を除く全ての指定国について): 科学技術振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION) [JP/JP]; 〒332-0012 埼玉県 川口市 本町四丁目 1 番 8 号 Saitama (JP).

[続葉有]

(54) Title: MODEL ANIMALS NON-RESPONSIVE TO MYCOBACTERIA-ORIGIN LIPOPROTEIN/LIPOPEPTIDE

(54)発明の名称: マイコバクテリア由来リポタンパク/リポペプチド不応答性モデル動物



AA...WILD TYPE ALLELE

BB...PROBE

CC...TARGETING VECTOR

DD...MUTANT ALLELE

WO 03/105578 A1

(57) Abstract: It is intended to provide TLR1 knockout mice specifically recognizing a mycobacteria-origin lipoprotein/lipopptide, which are useful in clarifying the role of TLR1 *in vivo*, and a method of screening a promoter or an inhibitor for a response to a mycobacteria-origin lipoprotein/lipopptide with the use of the same. The TLR1 knockout mice are constructed by isolating a TLR1 gene from a mouse gene library, substituting a part of the TLR1 gene containing the intracellular domain and the transmembrane domain by a neomycin tolerance gene, transferring an HSV-tk gene encoding thymidine kinase into the 3' -terminal side thereof, screening an ES cell clone double-resistant to G418 and ganciclovir, injecting the ES cell clone into the blastocyst of a C57BL/6 mouse and then getting the newborns from the reproductive system thereof.

[続葉有]



2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

---

(57) 要約:

T L R 1 のインビボにおける役割を明らかにする上で有用な、マイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドを特異的に認識する T L R 1 ノックアウトマウスや、これらを用いたマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドに対する応答の促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法を提供するものである。T L R 1 の遺伝子を、マウス遺伝子ライブラリーから単離し、この T L R 1 遺伝子の細胞内領域及び膜貫通領域を含む遺伝子部位を、ネオマイシン耐性遺伝子に置き換え、またそれぞれの 3' 末端側にチミジンキナーゼをコードする遺伝子である H S V - t k 遺伝子を導入させて、G 4 1 8 とガンシクロビアに対して 2 重に抵抗力のある E S 細胞クローンをスクリーニングし、この E S 細胞クローンを C 5 7 B L / 6 のマウスの胚盤胞中に注入し、その生殖系列をとおして出生してくる T L R 1 ノックアウトマウスを作製する。

## 明 細 書

マイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチド不応答性モデル動物

## 5 技術分野

本発明は、マイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドを特異的に認識する T L R 1 等のタンパク質をコードする遺伝子の機能が染色体上で欠損した、マイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチド不応答性モデル非ヒト動物や、これらモデル非ヒト動物を用いたマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドに対する応答の促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法等に関する。

## 背景技術

トール（T o 1 1）遺伝子は、ショウジョウバエの胚発生中の背腹軸の決定（Cell 52, 269-279, 1988, Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 12, 393-416, 1996）、また成体における侵入病原体を検出する自然免疫に関与しており（Nature 406, 782, 2000; Nat. Immunol. 2, 675, 2001; Annu. Rev. Immunol. 20, 197, 2002）、かかる T o 1 1 は、細胞外領域にロイシンリッチリピート（L R R）を有する I 型膜貫通受容体であり、この細胞質内領域は、哺乳類インターロイキン-1 受容体（I L - 1 R）の細胞質内領域と相同性が高いことが明らかとなっている（Nature 351, 355-356, 1991, Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 12, 393-416, 1996, J. Leukoc. Biol. 63, 650-657, 1998）。

近年、T o 1 1 様受容体（T L R : Tool Like Receptor）と呼ばれる T o 1 1 の哺乳類のホモログが同定され（Nature 388, 394-397, 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 588-593, 1998, Blood 91, 4020-4027,

1998, *Gene* 231, 59–65, 1999)、ヒトTLRファミリーについては、TLR2やTLR4などこれまでに10種が報告されている。TLRファミリーの役割は、細菌の共通構造を認識するパターン認識受容体（PRR : pattern recognition receptor）として、別々の病原体会合分子パターン（PAMPs : pathogen-associated molecular patterns）を識別し、転写因子であるNF- $\kappa$ Bの核内への移行を導く同様の細胞内シグナル伝達経路の活性化を引き起こす。かかるシグナル伝達経路は、最終的には炎症性サイトカインを産生させ、宿主防衛反応を誘起し、さらに獲得免疫に対しても宿主防衛反応を誘起させる。また、近年多くのTLRリガンドが報告されている。

TLR2は、ペプチドグリカン（PGN）、細菌由来トリアシル化リポタンパク質、マイコプラズマ由来ジアシル化リポタンパク質、及び*Trypanosoma cruzi*（クルーズトリパノソーマ）のGPIアンカーなどのさまざまな細菌成分を認識する（*Science* 285, 732, 1999; *Science* 285, 736, 1999; *J.Biol. Chem.* 274, 33419, 1999; *Immunity* 11, 443, 1999; *J. Immunol.* 164, 554, 2000; *Nature* 401, 811, 1999; *J. Immunol.* 167, 416, 2001）。TLR4は、グラム陰性菌の細胞壁に特異的な糖脂質であるLPSに応答する際必須である。TLR5は、細菌の鞭毛のタンパク質成分であるフラジェリンを認識するとされている。さらに、病原体特異的なヌクレオチド、及びヌクレオチド類似体もTLRが認識する。つまり、TLR3、TLR7及びTLR9は、ウィルス二重鎖RNA、イミダゾキノリン、非メチル化CpGモチーフを有する細菌DNAの認識に、それぞれ関与している（*Nature* 406, 782, 2000; *Nat. Immunol.* 2, 675, 2001; *Annu. Rev. Immunol.* 20, 197, 2002; *Nat. Immunol.* 3, 196, 2002）。

TLRはヘテロ二量体を形成するので、リガンドの特異性をさらに明

確にことができる。特に、TLR 6は、TLR 2と相互作用してマイコバクテリア由来リポタンパク質を識別する独特の性質を有している(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 13766, 2000; Int. Immunol. 13, 933, 2001)。TLR 6欠損(TLR 6<sup>-/-</sup>)マウスは、マクロファージ活性化リポペプチド2-kD(MALP-2)と呼ばれるジアシル化マイコプラズマ由来リポペプチドに応答し、炎症性サイトカインを産生しない。その一方、トリアシル化細菌由来リポペプチドに対しては、正常な応答を示す。TLR 2<sup>-/-</sup>マクロファージは、前記リポペプチドのどちらにも応答しない(Int. Immunol. 13, 933, 2001)。つまり、TLR 6は、細菌病原体に由来するリポペプチドのアシル化における僅かな相違を区別していることがわかる。また、TLR 2が別のTLRとともにヘテロ二量体を形成し、かかるトリアシル化リポペプチド中の他のPAMPsを識別するという可能性が生じる。

他方、リポタンパク質は、マイコバクテリア、グラム陰性菌、及びマイコプラズマ種を含む多様な病原体によって產生される(Microbiol. Rev. 60, 316, 1996)。N末端アシル化リポペプチド領域は、細菌由来及びマイコプラズマ由来リポタンパク質の免疫活性化作用に関与している。細菌由来のリポタンパク質とマイコプラズマ由来のリポタンパク質とでは、N末端システインのアシル化の程度が異なっている。細菌由来のリポタンパク質ではトリアシル化されているのに対し、マイコプラズマ由來のものではジアシル化されている(Trends Microbiol. 7, 493, 1999)。N-アシル-S-ジアシルシステイン及びS-ジアシルシステインがパルミトイ化してなる合成リポタンパク質類似体は、それぞれ細菌由来及びマイコプラズマ由来のリポタンパク質に似た免疫活性化作用を示す(Immunobiology 177, 158, 1988; J. Exp. Med. 185, 1951, 1997)。

TLR 1はTLR 6と類似性が高い(Gene 231, 59, 1999)。TLR 1

の過剰発現により、*Staphylococcus epidermidis*（表皮ブドウ球菌）から分泌されるフェノール可溶性タンパク質であるモジュリンに対し、T L R 2 を介する応答が阻害されると報告されている（J. Immunol. 166, 15, 2001）。一方、*Neisseria meningitidis*（髄膜炎菌）から放出される  
5 可溶性因子の識別に T L R 1 が関与しているとの報告もある（J. Immunol. 165, 7125, 2000）。しかし、T L R 1 のインビボでのリガンドはまだ解明されていない。

インビボにおける菌体成分に対する応答は、細胞表面上の各 T L R の  
10 発現レベルの差異により変化することが予測されるものの、未だインビボにおける菌体成分刺激によるシグナル伝達に対する T L R ファミリーの各メンバーの関わりは明らかにされていない。また、生体膜などに存在する水不溶性のリポタンパク／リポペプチドが免疫細胞を活性化することは知られていた。しかし、マイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドを特異的に認識するタンパク質は知られていなかった。本発明の課題は、インビボにおけるマイコバクテリア由来リポタンパク／リ  
15 ポペプチド刺激によるシグナル伝達に対する T L R ファミリー各メンバーの関わり、特に T L R 1 のインビボにおける役割を明らかにする上で有用な、マイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドを特異的に認識するタンパク質をコードする遺伝子の機能が染色体上で欠損した、  
20 マイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチド不応答性モデル非ヒト動物、特に T L R 1 遺伝子の機能が染色体上で欠損した非ヒト動物や、これらを用いたマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドに対する応答の促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法を提供することにある。

本発明者は、既に同定されている TLR1 の遺伝子を、マウス遺伝子ライブラリーから単離し、この TLR1 遺伝子の細胞内領域及び膜貫通領域を含む遺伝子部位を、ネオマイシン耐性遺伝子に置き換え、またそれぞれの 3' 末端側にチミジンキナーゼをコードする遺伝子である HS 5 V-tk 遺伝子を導入させて、G418 とガンシクロビアに対して 2 重に抵抗力のある ES 細胞クローンをスクリーニングし、この ES 細胞クローンを C57BL/6 のマウスの胚盤胞(blastocysts)の中に注入し、その生殖系列をとおして、メンデルの法則に従い出生してくる TLR1 10 遺伝子機能が染色体上で欠損した TLR1 ノックアウトマウスを作製し、この TLR1 ノックアウトマウスと野生型マウスと TLR2 ノックアウトマウスとを比較・解析することにより、TLR1 がマイコバクテリア由来リポタンパク/リポペプチドを特異的に認識する受容体タンパク質であることを確認し、本発明を完成するに至った。

すなわち本発明は、マイコバクテリア由来リポタンパク/リポペプチドを特異的に認識するタンパク質をコードする遺伝子の機能が染色体上で欠損したことを特徴とするマイコバクテリア由来リポタンパク/リポペプチド不応答性モデル非ヒト動物（請求項 1）や、合成トリアシル化リポペプチドを特異的に認識するタンパク質をコードする遺伝子の機能が染色体上で欠損したことを特徴とする請求項 1 記載のマイコバクテリア由来リポタンパク/リポペプチド不応答性モデル非ヒト動物（請求項 2）や、合成トリアシル化リポペプチドが、N-パルミトイル-S-ジラウリルグリセリルであることを特徴とする請求項 2 記載のマイコバクテリア由来リポタンパク/リポペプチド不応答性モデル非ヒト動物（請求項 3）や、マイコバクテリア由来リポタンパク/リポペプチドを特異的に認識するタンパク質が、TLR1 であることを特徴とする請求項 1 25 ~ 3 のいずれか記載のマイコバクテリア由来リポタンパク/リポペプチ

ド不応答性モデル非ヒト動物（請求項 4）や、非ヒト動物が齧歯目動物であることを特徴とする請求項 1～4 のいずれか記載のマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチド不応答性モデル非ヒト動物（請求項 5）や、齧歯目動物がマウスであることを特徴とする請求項 5 記載のマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチド不応答性モデル非ヒト動物（請求項 6）や、マウスが、マウス遺伝子ライブラリーからマウス EST クローン由来のプローブを用いてスクリーニングすることにより得られた TLR 1 遺伝子の細胞内領域及び膜貫通領域を含む遺伝子部位の全部又は一部の遺伝子フラグメントを、マーカー遺伝子をもつプラスミドに置換してターゲッティングベクターを構築し、該ターゲッティングベクターを線状化したのち胚幹細胞に導入し、TLR 1 遺伝子機能を欠損した標的胚幹細胞を、マウスの胚盤胞中にマイクロインジェクションし、キメラマウスを作製し、このキメラマウスと野生型マウスとを交配させてヘテロ接合体マウスを作製し、かかるヘテロ接合体マウスをイントークロスすることによって得られる TLR 1 ノックアウトマウスであることを特徴とする請求項 6 記載のマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチド不応答性モデル非ヒト動物（請求項 7）や、請求項 1～7 のマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチド不応答性モデル非ヒト動物に由来する免疫細胞と、被検物質と、マイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドとを用いて、前記免疫細胞におけるマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドに対する応答を測定・評価することを特徴とするマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドに対する応答の促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法（請求項 8）に関する。

また本発明は、請求項 1～7 のマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチド不応答性モデル非ヒト動物と、被検物質と、マイコバクテ

リア由来リポタンパク／リポペプチドとを用いて、前記非ヒト動物におけるマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドに対する応答を測定・評価することを特徴とするマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドに対する応答の促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法（請求項 9）や、マイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドに対する応答を測定・評価するに際し、対照としての同腹の野生型非ヒト動物との比較・評価を行うことを特徴とする請求項 8 又は 9 記載のマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドに対する応答の促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法（請求項 10）や、マイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドに対する応答の促進物質又は抑制物質が、TLR 1 に対するアゴニスト又はアンタゴニストであることを特徴とする請求項 8～10 のいずれか記載のマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドに対する応答の促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法（請求項 11）や、マイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドに対する応答の促進物質が、マイコバクテリア感染症に対する予防・治療薬であることを特徴とする請求項 8～11 のいずれか記載のマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドに対する応答の促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法（請求項 12）や、マイコバクテリア感染症が、結核又は結核以外のマイコバクテリア感染症であることを特徴とする請求項 12 記載のマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドに対する応答の促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法（請求項 13）や、請求項 8～13 のいずれか記載のマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドに対する応答の促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法により得られることを特徴とするマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドに対する応答の促進物質又は抑制物質（請求項 14）や、マイコバクテリア由来リポタンパク／リポ

ペプチドに対する応答の促進物質又は抑制物質が、TLR 1に対するアゴニスト又はアンタゴニストであることを特徴とする請求項14記載のマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドに対する応答の促進物質又は抑制物質（請求項15）や、マイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドに対する応答の促進物質が、マイコバクテリア感染症に対する予防・治療薬であることを特徴とする請求項14又は15記載のマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドに対する応答の促進物質又は抑制物質（請求項16）や、マイコバクテリア感染症が、結核又は結核以外のマイコバクテリア感染症であることを特徴とする請求項15記載のマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドに対する応答の促進物質又は抑制物質（請求項17）に関する。

さらに本発明は、TLR 1及びTLR 2の発現系を含むことを特徴とするマイコバクテリア感染症の予防・治療薬（請求項18）や、マイコバクテリア感染症が、結核又は結核以外のマイコバクテリア感染症であることを特徴とする請求項18記載のマイコバクテリア感染症の予防・治療薬（請求項19）に関する。

#### 図面の簡単な説明

第1図は、本発明のTLR 1ノックアウトマウス、野生型マウス及びターゲッティングベクターの遺伝子地図を示す図である。

第2図は、本発明のTLR 1ノックアウトマウスのサザンプロット分析の結果を示す写真である。

第3図は、本発明のTLR 1ノックアウトマウスのノーザンプロット分析の結果を示す写真である。

第4図は、本発明のTLR 1ノックアウトマウス及び野生型マウスにおける19kDリポタンパク質刺激によるTNF $\alpha$ 産生の結果を示す図

である。

第5図は、本発明のTLR1ノックアウトマウス及び野生型マウスにおけるLPS及びPGN刺激によるTNF $\alpha$ 産生の結果を示す図である。

第6図は、本発明のTLR1ノックアウトマウス及び野生型マウスにおけるリポタンパク質、LPS刺激に応答したIL-6の産生の結果を示す図である。

第7図は、本発明のTLR1ノックアウトマウス及び野生型マウスにおけるBCG刺激によるTNF $\alpha$ 産生の結果を示す図である。

第8図は、本発明のTLR1ノックアウトマウス、TLR2ノックアウトマウス、及び野生型マウスにおけるPam<sub>3</sub>Csk<sub>4</sub>刺激によるTNF $\alpha$ 産生の結果を示す図である。

第9図は、本発明のTLR1ノックアウトマウス、TLR2ノックアウトマウス、及び野生型マウスにおけるMALP-2刺激によるTNF $\alpha$ 産生の結果を示す図である。

第10図は、本発明のTLR1、TLR2及びTLR6の共発現のPam<sub>3</sub>Csk<sub>4</sub>刺激に誘導されたNF- $\kappa$ Bの活性化の結果を示す図である。

第11図は、本発明のHA標識TLR1の免疫沈降を行った結果を示す図である。

第12図は、本発明のTLR1ノックアウトマウス、TLR2ノックアウトマウス、及び野生型マウスにおけるMyr<sub>3</sub>Csk<sub>4</sub>刺激によるTNF $\alpha$ 産生の結果を示す図である。

第13図は、本発明のTLR1ノックアウトマウス、TLR2ノックアウトマウス、及び野生型マウスにおけるLau<sub>3</sub>Csk<sub>4</sub>刺激によるTNF $\alpha$ 産生の結果を示す図である。

第14図は、本発明のTLR1ノックアウトマウス、TLR2ノック

アウトマウス、及び野生型マウスにおける  $\text{Lau}_2\text{N-PamCSK}_4$  刺激による TNF $\alpha$  產生の結果を示す図である。

第 15 図は、本発明の TLR1 ノックアウトマウス、TLR2 ノックアウトマウス、及び野生型マウスにおける JBT3002 刺激による TNF $\alpha$  產生の結果を示す図である。  
5

#### 発明を実施するための最良の形態

本発明のマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチド不応答性モデル非ヒト動物としては、マイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドを特異的に認識するタンパク質をコードする遺伝子の機能が染色体上で欠損したヒト以外のモデル動物であれば特に制限されるものではないが、マイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドに加えて、N-パルミトイール-S-ジラウリルグリセリル等の合成トリアシル化リポペプチドを特異的に認識するタンパク質をコードする遺伝子の機能が染色体上で欠損したヒト以外のモデル動物であることが好ましく、例えば、マイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドを特異的に認識するタンパク質をコードする非ヒト動物の内在性遺伝子の全部又は一部を、破壊・欠損・置換等の遺伝子変異により、その機能を不活性化させることにより、マイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドを特異的に認識するタンパク質をコードする遺伝子の機能を染色体上で欠損させることができる。また、上記マイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドを特異的に認識するタンパク質としては、マイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドを特異的に認識するタンパク質として、マイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドを特異的に認識するタンパク質であれば特に制限されるものではなく、例えば、TLR1 や TLR1 活性を有するその一部を具体的に挙げができる。かかるマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドを特異的に認識するタ

10  
15  
20  
25

ンパク質は、そのDNA配列情報等に基づき公知の方法で調製することができる。また、本発明におけるマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドには、マイコバクテリアに由来するリポタンパク／リポペプチドの他、マイコバクテリア菌体自体又はその処理物、M A L P - 2 等の合成マイコバクテリア由来リポペプチドなども便宜上含まれる。

5 本発明のマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチド不応答性モデル非ヒト動物は、野生型非ヒト動物に比べて、マイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドによる刺激に対する生体又は生体を構成する細胞、組織若しくは器官の反応性が特異的に低下しているか、あるいは失われている非ヒト動物、すなわち、スピロヘーターやグラム陰性菌等マイコバクテリア以外のリポタンパク／リポペプチドによる刺激に対しては正常に生体又は生体を構成する細胞、組織若しくは器官において反応性を有するが、マイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドにおいては、生体又は生体を構成する細胞、組織若しくは器官の反応性が低下しているか、あるいは失われているマウス、ラット、ウサギ等のヒト以外の動物をいい、具体的には、T L R 1 ノックアウトマウス等のT L R 1 遺伝子の機能が染色体上で欠損した非ヒト動物を具体的に挙げることができる。また、上記マイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドによる刺激としては、マイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドを生体に投与するインビボでの刺激や、生体から分離された細胞にマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドを接触させるインビトロでの刺激等を挙げることができる。

20 次に、本発明のマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチド不応答性モデル非ヒト動物の作製方法を、T L R 1 ノックアウトマウスを例にとって説明する。マウス遺伝子ライブラリーからP C R 等の方法により得られた遺伝子断片を用いて、T L R 1 をコードする遺伝子をスク

リーニングし、スクリーニングされた TLR 1 をコードする遺伝子を、ウイルスベクター等を用いてサブクローンし、DNA シーケンシングにより特定する。この TLR 1 をコードする遺伝子の全部又は一部を pM  
5 C 1 ネオ遺伝子カセット等に置換し、3' 末端側にジフテリアトキシン A フラグメント (DT-A) 遺伝子や単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ (HSV-tk) 遺伝子等の遺伝子を導入することによって、ターゲットベクターを作製する。

この作製されたターゲティングベクターを線状化し、エレクトロポレーション（電気穿孔）法等によって ES 細胞に導入し、相同的組換えを行い、その相同的組換え体の中から、G418 やガンシクロビア (GAN)  
10 等の抗生物質により相同的組換えを起こした ES 細胞を選択する。また、この選択された ES 細胞が目的とする組換え体かどうかをサザンプロット法等により確認することが好ましい。その確認された ES 細胞のクローンをマウスの胚盤胞中にマイクロインジェクションし、かかる  
15 胚盤胞を仮親のマウスに戻し、キメラマウスを作製する。このキメラマウスを野生型マウスと交雑させると、ヘテロ接合体マウス (F1 マウス : +/−) を得ることができ、また、このヘテロ接合体マウスを交雑させることによって、本発明の TLR 1 ノックアウトマウスを作製することができる。また、TLR 1 ノックアウトマウスにおいて、TLR 1 が生  
20 起しているかどうかを確認する方法としては、例えば、上記の方法により得られたマウスから RNA を単離してノーザンプロット法等により調べたり、またこのマウスにおける TLR 1 の発現をウエスタンプロット法等により調べる方法がある。

また、作出された TLR 1 ノックアウトマウスがマイコバクテリア由  
25 来リポタンパク / リポペプチドに対して不応答性であることは、例えば、マイコバクテリア由来リポタンパク / リポペプチドを TLR 1 ノックア

ウトマウスのマクロファージ、単核細胞、樹状細胞などの免疫細胞にインビトロ又はインビボで接触せしめ、かかる細胞におけるTNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-12、IFN- $\gamma$ 等の産生量や、脾臓B細胞の増殖応答や、脾臓B細胞表面でのCD40、CD80、CD86、MHCクラスII等の抗原の発現量や、NF- $\kappa$ B、JNK、IRAK等のTLR1 5 のシグナル伝達経路における分子の活性化を測定することにより確認することができる。そして、本発明のTLR1ノックアウトマウスは、マイコバクテリア由来リポタンパク/リポペプチドの作用機序の解明や、マイコバクテリア感染に対する治療戦略を考案する上で有用なモデルと 10 することができる。

ところで、メンデルの法則に従い出生してくるホモ接合体非ヒト動物には、マイコバクテリア由来リポタンパク/リポペプチドを特異的に認識するタンパク質欠損型とその同腹の野生型とが含まれ、これらホモ接合体非ヒト動物における欠損型とその同腹の野生型を同時に用いることによって個体レベルで正確な比較実験をすることができることから、野生型の非ヒト動物、好ましくはマイコバクテリア由来リポタンパク/リポペプチドを特異的に認識するタンパク質をコードする遺伝子の機能が染色体上で欠損した非ヒト動物と同種の野生型非ヒト動物、さらには同腹の動物を、例えば以下に記載する本発明のマイコバクテリア由来リポタンパク/リポペプチドに対する応答の促進物質又は抑制物質のスクリーニングに際して併用することが好ましい。

本発明のマイコバクテリア由来リポタンパク/リポペプチド不応答性モデル非ヒト動物や該モデル非ヒト動物由来のマクロファージ、脾臓細胞、樹状細胞等の免疫細胞は、マイコバクテリア由来リポタンパク/リポペプチドの作用機序の解明の他、TLR1に対するアゴニスト若しくはアンタゴニストなどのマイコバクテリア由来リポタンパク/リポペプ

チドに対する応答の抑制物質若しくは促進物質のスクリーニングや、肺結核等のマイコバクテリア感染症に対する予防・治療薬のスクリーニング等に用いることができる。かかるTLR1に対するアゴニスト若しくはアンタゴニストなどのマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドに対する応答の促進物質若しくは抑制物質のスクリーニング方法を、  
5 以下に例を挙げて説明する。

本発明のマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドに対する応答の促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法としては、マイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチド不応答性モデル非ヒト動物に由来するマクロファージ、脾臓細胞、樹状細胞等の免疫細胞と、被検物質と、マイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドとを用いて、かかる免疫細胞におけるマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドに対する応答を測定・評価する方法や、マイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチド不応答性モデル非ヒト動物と、被検物質と、マイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドとを用いて、かかるモデル非ヒト動物におけるマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドに対する応答を測定・評価する方法等を挙げることができる。  
10  
15

上記マイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチド不応答性モデル非ヒト動物に由来する免疫細胞を用いたスクリーニング方法としては、マイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチド不応答性モデル非ヒト動物から得られる免疫細胞と被検物質とをあらかじめインビトロで接觸せしめた後、かかる免疫細胞をマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドの存在下で培養し、該免疫細胞におけるマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドに対する応答を測定・評価する方法や、マイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチド不応答性モデル非ヒト動物から得られる免疫細胞とマイコバクテリア由来リポタンパク／リ  
20  
25

ポペプチドとをあらかじめインピトロで接触せしめた後、該免疫細胞を被検物質の存在下で培養し、該免疫細胞におけるマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドに対する応答を測定・評価する方法を挙げることができる。

5 また、マイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチド不応答性モデル非ヒト動物にあらかじめ被検物質を投与した後、該非ヒト動物から得られる免疫細胞をマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドの存在下で培養し、該免疫細胞におけるマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドに対する応答を測定・評価する方法や、本発明のマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチド不応答性モデル非ヒト動物にあらかじめ被検物質を投与した後、該非ヒト動物にマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドを投与し、該非ヒト動物から得られる免疫細胞におけるマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドに対する応答を測定・評価する方法を挙げることができる。

10 15 また、本発明のマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチド不応答性モデル非ヒト動物をあらかじめマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドを投与した後、該非ヒト動物から得られる免疫細胞を被検物質の存在下で培養し、該免疫細胞におけるマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドに対する応答を測定・評価する方法や、本発明のマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチド不応答性モデル非ヒト動物をあらかじめマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドを投与した後、該非ヒト動物に被検物質を投与し、該非ヒト動物から得られる免疫細胞におけるマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドに対する応答を測定・評価する方法を挙げることができる。

20 25 また、本発明のマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチド不応答性モデル非ヒト動物と、被検物質と、マイコバクテリアを用いて、

かかるモデル非ヒト動物におけるマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドに対する応答を測定・評価する方法としては、マイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチド不応答性モデル非ヒト動物にあらかじめ被検物質を投与した後、該モデル非ヒト動物をマイコバクテリアに感染させ、該モデル非ヒト動物におけるマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドに対する応答を測定・評価する方法や、マイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチド不応答性モデル非ヒト動物をあらかじめマイコバクテリアに感染させた後、該モデル非ヒト動物に被検物質を投与し、該モデル非ヒト動物におけるマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドに対する応答を測定・評価する方法を挙げることができる。

本発明においてマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドに対する応答の測定・評価とは、マイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドと特異的に反応し、細胞内にシグナルを伝達する機能の測定・評価をいい、かかるシグナル伝達機能としては、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-12、IFN- $\gamma$ 等のサイトカインを産生する機能や、亜硝酸イオンを産生する機能や、細胞を増殖する機能や、細胞表面においてCD40、CD80、CD86、MHCクラスII等の抗原を発現する機能や、NF- $\kappa$ B、JNK、IRAK等のTLR9のシグナル伝達経路における分子を活性化させる機能などを具体的に例示することができるが、これらに限定されるものではない。また前記したように、マイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドに対する応答を測定・評価するに際し、対照として同腹の野生型非ヒト動物、特に同腹の野生型非ヒト動物の測定値と比較・評価することが個体差によるバラツキをなくすることができるので好ましい。

本発明のマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドに対する

反応性を特異的に欠如したモデル非ヒト動物により、T L R 1 がマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドの認識に特異的に関与していることが明らかとなつたことから、これらのモデル非ヒト動物は、結核菌による肺結核や腎結核等に対する治療戦略を考案する上で、非常に有用なモデル動物となることが考えられる。また T L R 1 のアゴニストは、上記各種マイコバクテリア感染症等の T L R 1 活性の欠失又は異常に起因する疾病等の診断・治療に有用な物質である可能性がある。

T L R 1 と T L R 2 は哺乳類細胞中での相互作用し、マイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドに対する応答性を一層高めることから、これらを宿主細胞内で共発現させると、マイコバクテリア感染症の予防・治療薬となりうる。本発明の T L R 1 及び T L R 2 の発現系を含むマイコバクテリア感染症の予防・治療薬における発現系としては、上記 T L R 1 及び T L R 2 を宿主細胞内で発現させることができる発現系であればどのようなものでもよいが、S V 4 0 のようなパポバウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルス、レトロウイルス由來のウイルスベクターに、T L R 1 や T L R 2 をコードする遺伝子を個別にインテグレーションしたものや、T L R 1 及び T L R 2 をコードする遺伝子をコインテグレーションしたものを例示することができる。この発現系は発現を起こさせるだけでなく発現を調節する制御配列を含んでいてもよい。

本発明において、予防・治療薬を医薬品として用いる場合は、薬学的に許容される通常の担体、結合剤、安定化剤、賦形剤、希釈剤、p H 緩衝剤、崩壊剤、可溶化剤、溶解補助剤、等張剤などの各種調剤用配合成分を添加することができる。またこれら医薬品を用いる予防若しくは治療方法においては、患者の性別・体重・症状に見合つた適切な投与量の上記予防・治療薬を、経口的又は非経口的に投与することができる。す

なわち通常用いられる投与形態、例えば粉末、顆粒、カプセル剤、シロップ剤、懸濁液等の剤型で経口的に投与することができ、あるいは、例えば溶液、乳剤、懸濁液等の剤型にしたものを注射の型で非経口投与することができる他、スプレー剤の型で鼻孔内投与することもできる。

5 以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

参考例（T L R 2 ノックアウトマウスの作製）

129/S V J マウス遺伝子ライブラリー（Stratagene 社製）から、ヒト T L R 2 遺伝子と類似したマウス E S T クローン由来のプローブを  
10 用いて、T L R 2 遺伝子をスクリーニングし、pBluescript ベクター（Stratagene 社製）中でサブクローンし、制限酵素マッピング及びD N A 配列決定により特定した。ターゲッティングベクターは、T L R 2 遺伝子の細胞内領域を含むエクソン部位 1. 3 k b の遺伝子フラグメントを、ポリ A シグナルをもつ pMC1-neo (Stratagene 社製) に置換することにより構築した。かかるターゲッティングベクターは、4. 8 k b の  
15 5' 遺伝子フラグメントと 1. 0 k b の 3' 遺伝子フラグメントとをフランкиング配列として有し、H S V - t k 力セットを 5' 末端に含んでいる。このターゲッティングベクターを S a 1 I により線状化し、胎生  
14. 1 日目の胚幹細胞（E S 細胞）にエレクトロポレーションした。上  
記エレクトロポレーションした E S 細胞から、G 4 1 8 及びガンシクロ  
ビアに抵抗性を示し、かつ突然変異 T L R 2 対立遺伝子を含有していた  
ものをスクリーニングし、かかる E S 細胞を C 5 7 B L / 6 マウスの胚  
盤胞中にマイクロインジェクションしキメラマウスを作製し、この雄の  
キメラマウスと C 5 7 B L / 6 雌マウスとを交配させることによって T  
25 L R 2 ノックアウトマウスを作製した（Immunity 11, 443-451, 1999）。

実施例 1（T L R 1 ノックアウトマウスの作製）

129Svマウス遺伝子ライブラリー(Clontech社製)から、マウス  
TLR1遺伝子由来のプローブを用いて、TLR1遺伝子をスクリーニングし、pBluescript II SK(+)ベクター(Stratagene社製)中でサブクローンし、制限酵素マッピング及びDNA配列決定により特定した。タ  
5 ゲッティングベクターは、マウスTLR1の細胞内領域及び膜貫通領  
域をコードする遺伝子部位(マウスTLR1のアミノ酸配列575-7  
95を含むエクソンの一部を、5'末端側から1.0kb及び3'末端  
側から10kbまで)を、ネオマイシン耐性遺伝子カセット(Stratagene  
社製)に置換し、負の選択マーカーとして単純ヘルペスウィルスチミジ  
10 ンキナーゼ(HSV-TK)を挿入することにより構築した(図1)。こ  
のターゲッティングベクターをSal Iにより線状化し、胎生14.1  
日目の胚幹細胞(ES細胞)にエレクトポレーションし、G418及び  
ガンシクロビアに抵抗性を示す125個のクローンを選択し、PCR法  
及びサザンプロット法により3個のクローンをスクリーニングした。

15 突然変異TLR1対立遺伝子を含有していた3個の標的ESクローン  
を、C57BL/6マウスの胚盤胞中にマイクロインジェクションして  
キメラマウスを作製した。この雄のキメラマウスをC57BL/6雌マ  
ウスと交配させ、ヘテロ接合体F1マウスを作製し、かかるヘテロ接合  
20 体F1マウスをインタークロスすることによってホモ接合体マウス(T  
LR1ノックアウトマウス: TLR1<sup>-/-</sup>)を得た。なお、ホモ接合体  
マウスの確認は、マウスの尾から抽出した各ゲノムDNAをEco RI  
でダイジェストし、図1に示すプローブを用いるサザンプロット法によ  
り行った(図2)。TLR1<sup>-/-</sup>マウスの腹腔マクロファージは、TLR  
1のmRNAを発現していなかった(図3)。これに対し、TLR1<sup>-/-</sup>  
25 マクロファージ中のTLR2のmRNAの発現は、野生型細胞の場合と比較して、正常であった。本発明のTLR1<sup>-/-</sup>はメンデルの法則

に従い作製することができ、健やかに成長し、繁殖可能で、生後 6 ヶ月までは明らかな異常を全く示さなかった。また、T L R 1<sup>-/-</sup>マウスにおける胸腺細胞及び脾細胞中のリンパ球群には、変化がなかった。

#### 実施例 2 (腹腔マクロファージの調製と酵素結合免疫吸着定量法)

5 野生型マウス (wild-type)、T L R 1ノックアウトマウス (T L R 1<sup>-/-</sup>) 及びT L R 2ノックアウトマウス (T L R 2<sup>-/-</sup>) のそれぞれの腹腔内に 4 % のチオグリコール酸培地 (D I F C O 社製) を 2 m l ずつ注入し、3 日後に各マウスの腹腔内から腹腔滲出細胞を単離し、これらの細胞を 1 0 % のウシ胎仔血清を添加した R P M I 1 6 4 0 培地  
10 (Nacalai tesque 社製) 中で 3 7 ℃ にて 2 時間培養し、腹腔マクロファージ ( $5 \times 10^4$ ) を培養し、示されたリポタンパク質等の細菌成分で 2 4 時間刺激した。培養上澄液中の T N F  $\alpha$  (Genzyme Techne 社製) 及び I L - 6 (R & D 社製) の濃度は、酵素結合免疫吸着定量法 (E L  
15 I S A) で測定した。

#### 15 (P A M P s に対する応答)

P A M P s には *Mycobacterium tuberculosis* (結核菌) から精製した未変性 1 9 k D リポタンパク質 (Science 285, 732, 1999 の記載に従い精製)、*Salmonella minnesota* Re595 の L P S、及び *Staphylococcus aureus* (黄色ブドウ球菌) の P G N を使用した。チオグリコール酸で刺  
20 激した野生型マウス及びT L R 1<sup>-/-</sup>マウスの腹腔マクロファージを、これらの P A M P s の存在下で 2 4 時間培養し、培養上澄液中の T N F  $\alpha$  の濃度を測定した。未変性 1 9 k D リポタンパク質を用いたときの結果を図 4 に、L P S 及び P G N を用いたときの結果を図 5 に示す。野生型マクロファージは、1 9 k D リポタンパク質に応答し、投与量依存的に T N F  $\alpha$  を産生したが、T L R 1<sup>-/-</sup>マクロファージによる T N F  $\alpha$   
25 の産生には、実験したリポタンパク質の濃度 5  $\mu$  g / m l 及び 1 0  $\mu$  g

/m<sup>1</sup>において、障害が認められた(図4)。一方、LPS及びPGNで刺激すると、TLR1<sup>-/-</sup>マクロファージは、野生型細胞とほぼ同程度、投与量依存的にTNF $\alpha$ を産生した(図5)。また、同様に、培養した腹腔マクロファージ( $5 \times 10^4$ )を未変性19kDリポタンパク質とLPSとでそれぞれ24時間刺激し、培養上澄液中のIL-6の濃度を測定した。図6に示す結果からもわかるように、未変性19kDリポタンパク質に応答したIL-6の産生も、TLR1<sup>-/-</sup>マクロファージでは、野生型細胞に比べ少なかったが、LPSに応答したIL-6の産生は両者間において大差がなかった。さらに、全てのマイコバクテリアの識別にTLR1が関与しているのかどうかについて検討するため、段階的に量を増加させた生菌のM. bovis(ウシ型結核菌)BCG(Kyowa社製)を用いて腹腔マクロファージを24時間刺激し、培養上澄液中のTNF $\alpha$ 濃度を測定した。BCGに応答してTNF $\alpha$ を産生する能力は、図7に示すように、TLR1<sup>-/-</sup>マクロファージでは部分的に損なわれていた。これらの結果から、TLR1は、生菌のマイコバクテリアだけではなく、マイコバクテリアから精製した19kDリポタンパク質の識別にも関与していることが判明した。

(合成アシル化リポペプチドに対する応答)

また、トリアシル化リポペプチド及びジアシル化リポペプチドの応答にはいずれもTLR2が必須であること、及びTLR6がTLR2と相互作用してジアシル化リポペプチドを特異的に識別することは、本発明者によってこれまでに示されている(Int. Immunol. 13, 933, 2001)。19kDリポタンパク質の調製に応答したサイトカインの産生は、TLR2<sup>-/-</sup>マクロファージでは阻害されていた(Science 291, 1544, 2001)。こうした結果はすべて、TLR1がTLR2とも相互作用して、トリアシル化リポタンパク質を識別していることを示している。TLR1が識

別する化学構造を解明するため、野生型マウス及び TLR1<sup>-/-</sup>マウスの腹腔マクロファージを、合成細菌由来トリアシル化ペプチドである Pam<sub>3</sub>Csk<sub>4</sub> 及び合成マイコプラズマ由来ジアシル化ペプチドである M A L P - 2 で刺激した。 TLR1<sup>-/-</sup>マクロファージでは、野生型細胞と比較して、Pam<sub>3</sub>Csk<sub>4</sub>に応答した TNF $\alpha$  の產生が有意に阻害されていたが（図 8）、TLR1<sup>-/-</sup>細胞は、M A L P - 2 に正常に応答していた（図 9）。これらの結果から、TLR1 がトリアシル化細菌由来リポタンパク質の識別に関与していることがわかる。また、TLR1 は、個々の TLR2 リガンドを識別し、リポペプチドのアシル化の程度を判別していることがわかる。

実施例 3 (TLR1、TLR2 及び TLR6 の共発現による、リポペプチドの刺激に応答した NF- $\kappa$ B 作用の調節)

TLR1、TLR2 及び TLR6 の発現ベクターで HEK293 細胞の形質転換を行い、その際に pELAM ルシフェラーゼレポータープラスマミドを使用した。リポフェクトアミン 2000 (Invitrogen 社製) による形質転換効率を標準化するため、示されたベクターを pELAM ルシフェラーゼリポータープラスマミド (J. Biol. Chem. 274, 10689, 1999) 及び pRL-TK (Promega 社製) と共に用いて、ヒト胎児腎臓 (HEK) 293 細胞の一時的な形質転換を行った。形質転換の 24 時間後、10 ng/m<sup>l</sup> の Pam<sub>3</sub>Csk<sub>4</sub> でかかる細胞を 8 時間刺激した。その後、細胞を溶解し、Dual-luciferase reporter assay system (Promega 社製) を製造者の指示通りに用い、ルシフェラーゼ活性を測定した。結果を図 10 に示す。TLR2 の発現は、Pam<sub>3</sub>Csk<sub>4</sub> 刺激に応答した NF- $\kappa$ B の活性化をもたらし、TLR1 の共発現は、かかる活性化を有意に増強した。これに対して、TLR6 と TLR2 の共発現により、Pam<sub>3</sub>Csk<sub>4</sub> 刺激に誘導された NF- $\kappa$ B の活性化が増強することはなか

った。こうした結果は、互いに協力して  $\text{Pam}_3\text{CSK}_4$  を識別する際に関与しているのが、TLR 6 ではなく TLR 1 及び TLR 2 であることを示している。

実施例 4 (TLR 1 及び TLR 2 の哺乳類細胞中での相互作用)

5     3  $\mu\text{g}$  の F1ag 標識 TLR 2、TLR 4、又は 6  $\mu\text{g}$  の HA 標識 TLR 1 を用い、HEK 293 細胞をコトランスフェクションした。36 時間後、1.0% の Nonidet P-40、150 mM の NaCl、20 mM のトリス HCl (pH 7.5)、5 mM の EDTA 及びプロテアーゼ阻害剤の混合液である Complete (Roche Diagnostics 社製) を含む溶解緩衝液 10 中で、かかる細胞を溶解した。タンパク質 G-セファロースを用い、かかる溶解液の前処理を 1 時間行い、2  $\mu\text{g}$  の抗 F1ag M2 抗体又は 2  $\mu\text{g}$  の抗 HA 12CA5 抗体及びタンパク質 G-セファロースを用い、免疫沈降を 12 時間行った。溶解緩衝液でビーズを 4 回洗浄し、免疫沈降したタンパク質を SDS-PAGE サンプル緩衝液中で溶出させ、SDS-PAGE 上で分離して PVDF 膜上に移した。抗 HA 抗体 (Roche Diagnostics 社製) 及び HRP 標識抗マウス Ig 抗体で、HA 標識 TLR 1 を検出した。二次抗体である HRP-conjugated 抗 Flag M2 抗体で、F1ag 標識タンパク質を同定した。その後、enhanced chemiluminescence system (DuPont 社製) で、かかる抗体の検出を行 15 った。

HA 標識 TLR 1 の免疫沈降を行った結果、F1ag 標識 TLR 2 については共沈降が生じたが、TLR 4 については生じなかった。HA 標識 TLR 1 も相互的に F1ag 標識 TLR 2 と共に沈降した (図 11)。しかし、 $\text{Pam}_3\text{CSK}_4$  刺激によって、TLR 1 - TLR 2 間の会合の程度が影響を受けることはなかった。これらの結果により、HEK 293 細胞中で TLR 1 と TLR 2 がリガンド非依存的に会合していることが 20 25

示唆される。

実施例 5 (T L R 1 及び T L R 2 が識別するリポペプチド)

T L R 1  $-/-$  マウスにおいては P a m<sub>3</sub> C S K<sub>4</sub>への応答は有意に阻害されていたが、本発明者は T L R 1 非依存的なサイトカインの産生を観察した。T L R 1 が識別する特異的なリガンドをさらに絞りこむため、N 末端の脂肪酸の組み合わせが異なるリポペプチドを合成した。合成 N - パルミトイール - S - ジパルミトイルグリセリル (P a m<sub>3</sub>) C S K<sub>4</sub>、及び M A L P - 2 の合成方法については、文献 (Science 285, 736, 1999; J. Immunol. 164, 554, 2000) の通りである。合成リポタンパク質類似体の J B T 3 0 0 2 は、文献 (J. Leukoc. Biol. 63, 766, 1998) の通りである。また、N - パルミトイール - S - ジラウリルグリセリル (N - P a m - S - L a u<sub>2</sub>) C S K<sub>4</sub>、N - ラウリル - S - ジラウリルグリセリル (L a u<sub>3</sub>) C S K<sub>4</sub>、N - ミリスチル - S - ジミリスチルグリセリル (M y r<sub>3</sub>) C S K<sub>4</sub>などの別のN 末端アシル機能を有する他のリポペプチド (Peptide Institute Inc. 社製) を使用した。これらはペプチドのN 末端システインで置換された脂肪酸の長さが異なっている。また、N - P a m - S - L a u<sub>2</sub> C S K<sub>4</sub>と J B T 3 0 0 2 の脂質部分は同一である。

野生型マウス、T L R 1  $-/-$  マウス及び T L R 2  $-/-$  マウスのマクロファージを上記合成ペプチド化合物 M y r<sub>3</sub> C S K<sub>4</sub>、L a u<sub>3</sub> C S K<sub>4</sub>、L a u<sub>2</sub> N - P a m C S K<sub>4</sub> 及び J B T 3 0 0 2 でそれぞれ刺激し、T N F  $\alpha$  の産生を測定した。結果を、それぞれ図 1 2 ~ 図 1 5 に示す。これらすべての合成ペプチドは野生型細胞を活性化し、投与量依存的に T N F  $\alpha$  を産生させていた。T L R 2  $-/-$  マウスのマクロファージについては、これらのリポペプチドのいずれかに応答した T N F  $\alpha$  の産生は全く検出されなかった。T L R 1  $-/-$  のマクロファージについては、M y r

<sub>3</sub>C S K<sub>4</sub>及びL a u<sub>3</sub>C S K<sub>4</sub>に応答したT N F  $\alpha$ の産生能力は損なわ  
れていた（図12及び図13）。また、L a u<sub>2</sub>N-P a m C S K<sub>4</sub>又は  
J B T 3 0 0 2で刺激した場合、T L R 1-/-細胞におけるT N F  $\alpha$ の  
産生がかなり損なわっていたが、このことは、T L R 1の識別にリポタ  
5 ッンパク質の脂質部分の微妙な相違が影響していることを示している（図  
14及び図15）。これらのことから、マイコバクテリア由来産物だけでは  
なくトリアシル化リポタンパク質の識別にもT L R 1が関与している  
という確証が得られた。T L R 1とT L R 2は、相互作用により協働し  
てP a m<sub>3</sub>C S K<sub>4</sub>を検出するが、これは、T L R 2がT L R 1又はT L  
10 R 6と対になって、異なるP A M P sを識別することを示している。

#### 産業上の利用可能性

本発明のT L R 1ノックアウトマウス等のマイコバクテリア由来リポ  
タンパク/リポペプチド不応答性モデル非ヒト動物は、マイコバクテリ  
ア由来リポタンパク/リポペプチドに対してのみ不応答性であるため、  
15 このモデル非ヒト動物を用いることによって、肺結核等のマイコバクテ  
リア感染症に対する抑制物質若しくは促進物質又はT L R 1に対するア  
ゴニスト若しくはアンタゴニストなどのマイコバクテリア由来リポタン  
パク/リポペプチドに対する応答性の抑制物質若しくは促進物質のスク  
20 リーニングが可能となり、ひいては、マイコバクテリア属をはじめとする  
細菌による感染成立の分子機構の解明における新たな有用情報を得る  
ことができる。

## 請求の範囲

1. マイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドを特異的に認識するタンパク質をコードする遺伝子の機能が染色体上で欠損したことを見5 特徴とするマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチド不応答性モデル非ヒト動物。
2. 合成トリアシル化リポペプチドを特異的に認識するタンパク質をコードする遺伝子の機能が染色体上で欠損したことを特徴とする請求項1記載のマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチド不応答性モデル非ヒト動物。
3. 合成トリアシル化リポペプチドが、N-パルミトイール-S-ジラウリルグリセリルであることを特徴とする請求項2記載のマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチド不応答性モデル非ヒト動物。
4. マイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドを特異的に認識するタンパク質が、TLR1であることを特徴とする請求項1～3のいずれか記載のマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチド不応答性モデル非ヒト動物。
5. 非ヒト動物が齧歯目動物であることを特徴とする請求項1～4のいずれか記載のマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチド不応答性モデル非ヒト動物。
6. 齧歯目動物がマウスであることを特徴とする請求項5記載のマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチド不応答性モデル非ヒト動物。
7. マウスが、マウス遺伝子ライブラリーからマウスESTクローン由來のプローブを用いてスクリーニングすることにより得られたTLR1遺伝子の細胞内領域及び膜貫通領域を含む遺伝子部位の全部又は一部の遺伝子フラグメントを、マーカー遺伝子をもつプラスミドに置換してタ25

一ゲッティングベクターを構築し、該ターゲッティングベクターを線状化したのち胚幹細胞に導入し、T L R 1 遺伝子機能を欠損した標的胚幹細胞を、マウスの胚盤胞中にマイクロインジェクションし、キメラマウスを作製し、このキメラマウスと野生型マウスとを交配させてヘテロ接合体マウスを作製し、かかるヘテロ接合体マウスをインタークロスすることによって得られるT L R 1 ノックアウトマウスであることを特徴とする請求項 6 記載のマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチド不応答性モデル非ヒト動物。

8. 請求項 1～7 のマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチド不応答性モデル非ヒト動物に由来する免疫細胞と、被検物質と、マイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドとを用いて、前記免疫細胞におけるマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドに対する応答を測定・評価することを特徴とするマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドに対する応答の促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法。

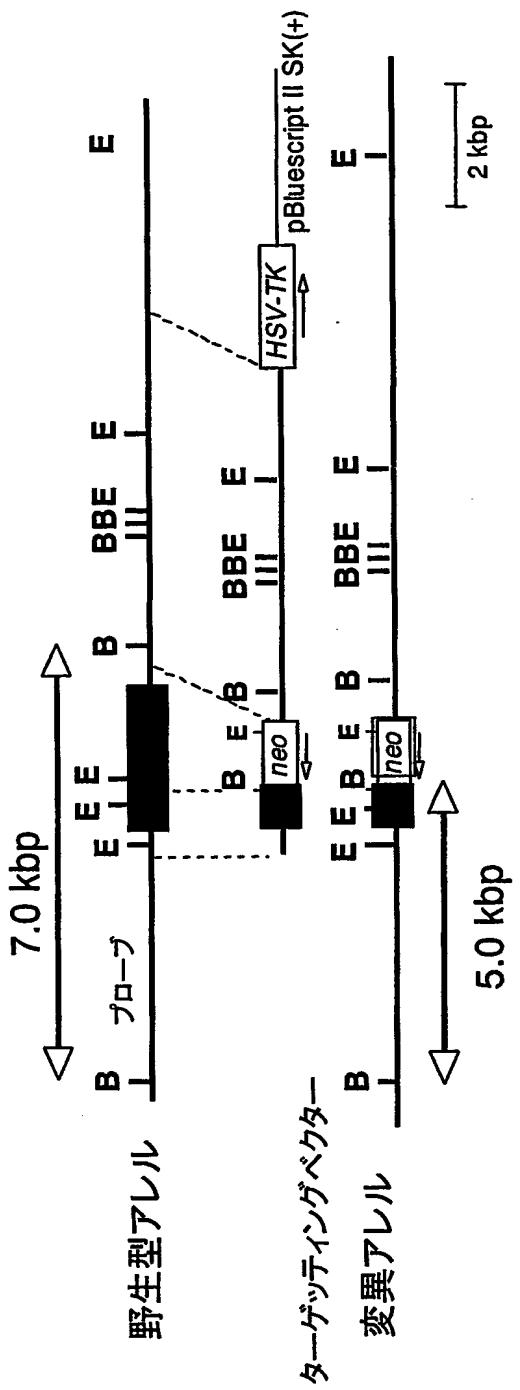
9. 請求項 1～7 のマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチド不応答性モデル非ヒト動物と、被検物質と、マイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドとを用いて、前記非ヒト動物におけるマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドに対する応答を測定・評価することを特徴とするマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドに対する応答の促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法。

10. マイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドに対する応答を測定・評価するに際し、対照としての同腹の野生型非ヒト動物との比較・評価を行うことを特徴とする請求項 8 又は 9 記載のマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドに対する応答の促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法。

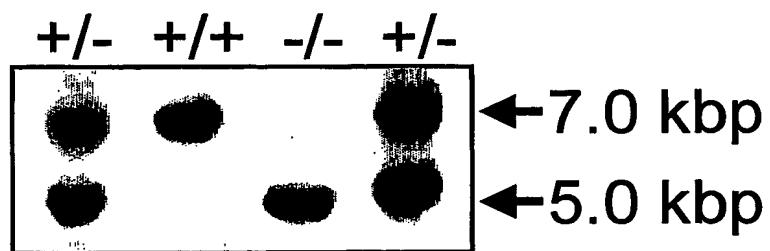
- 1 1. マイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドに対する応答の促進物質又は抑制物質が、T L R 1に対するアゴニスト又はアンタゴニストであることを特徴とする請求項 8～10 のいずれか記載のマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドに対する応答の促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法。  
5
- 1 2. マイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドに対する応答の促進物質が、マイコバクテリア感染症に対する予防・治療薬であることを特徴とする請求項 8～11 のいずれか記載のマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドに対する応答の促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法。  
10
- 1 3. マイコバクテリア感染症が、結核又は結核以外のマイコバクテリア感染症であることを特徴とする請求項 1 2 記載のマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドに対する応答の促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法。
- 1 4. 請求項 8～13 のいずれか記載のマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドに対する応答の促進物質又は抑制物質のスクリーニング方法により得られることを特徴とするマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドに対する応答の促進物質又は抑制物質。  
15
- 1 5. マイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドに対する応答の促進物質又は抑制物質が、T L R 1に対するアゴニスト又はアンタゴニストであることを特徴とする請求項 1 4 記載のマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドに対する応答の促進物質又は抑制物質。  
20
- 1 6. マイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドに対する応答の促進物質が、マイコバクテリア感染症に対する予防・治療薬であることを特徴とする請求項 1 4 又は 1 5 記載のマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドに対する応答の促進物質又は抑制物質。  
25

17. マイコバクテリア感染症が、結核又は結核以外のマイコバクテリア感染症であることを特徴とする請求項15記載のマイコバクテリア由来リポタンパク／リポペプチドに対する応答の促進物質又は抑制物質。
18. TLR 1及びTLR 2の発現系を含むことを特徴とするマイコバクテリア感染症の予防・治療薬。  
5
19. マイコバクテリア感染症が、結核又は結核以外のマイコバクテリア感染症であることを特徴とする請求項18記載のマイコバクテリア感染症の予防・治療薬。

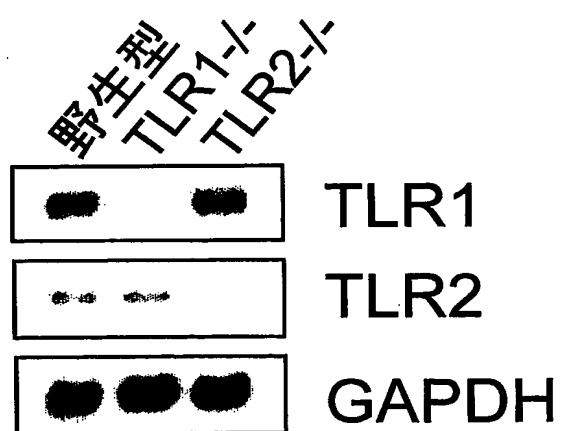
# 第 1 図



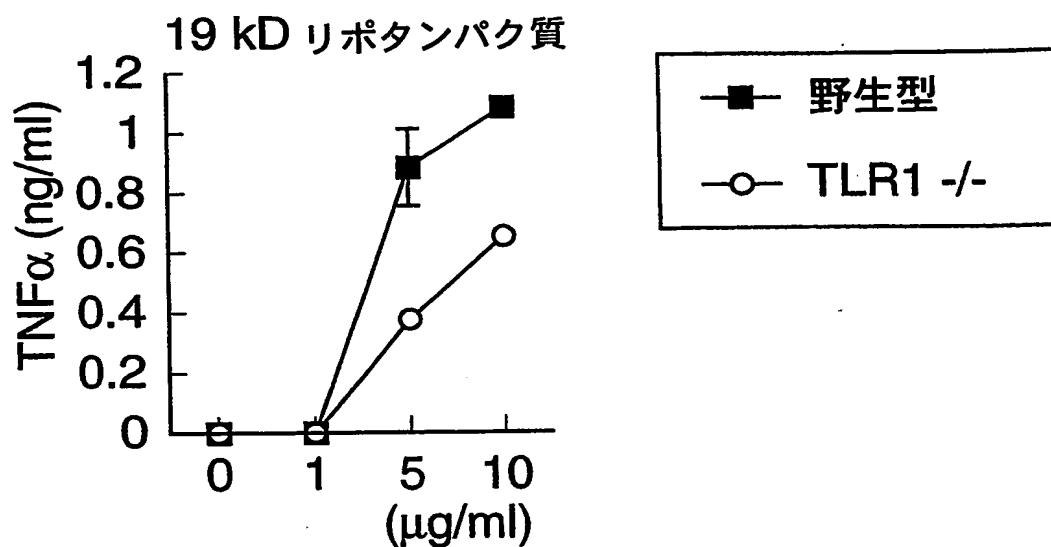
第 2 図



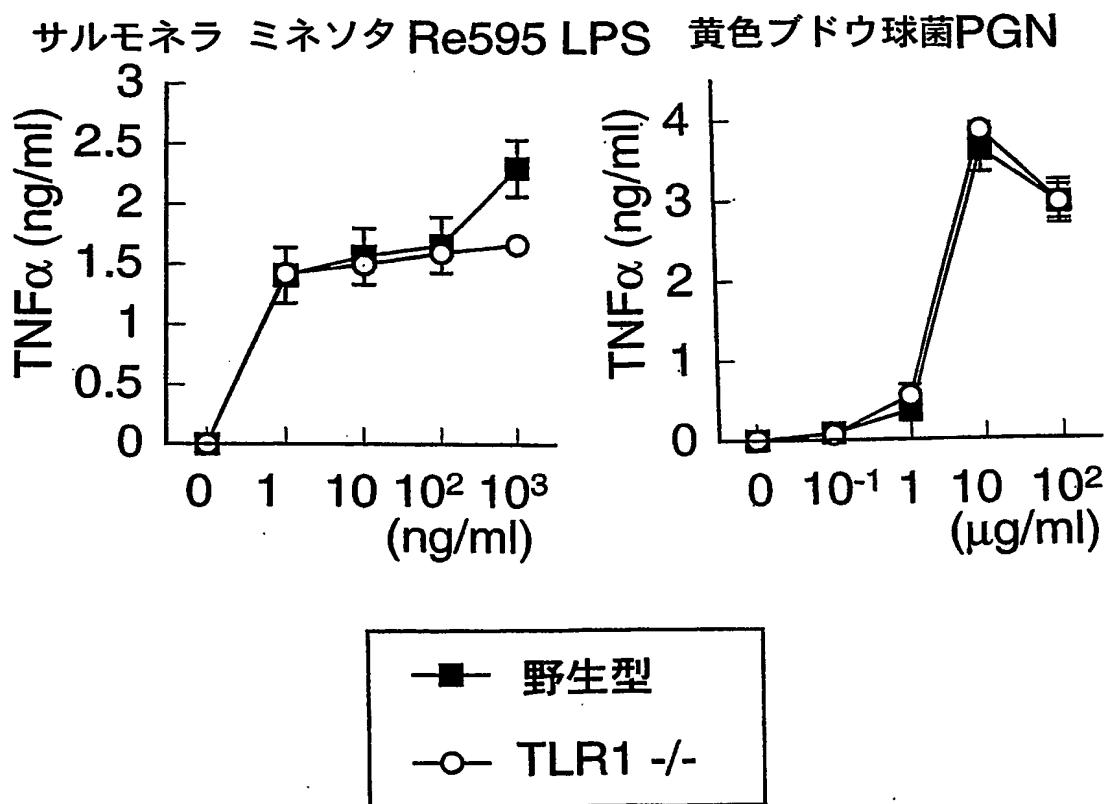
第 3 図



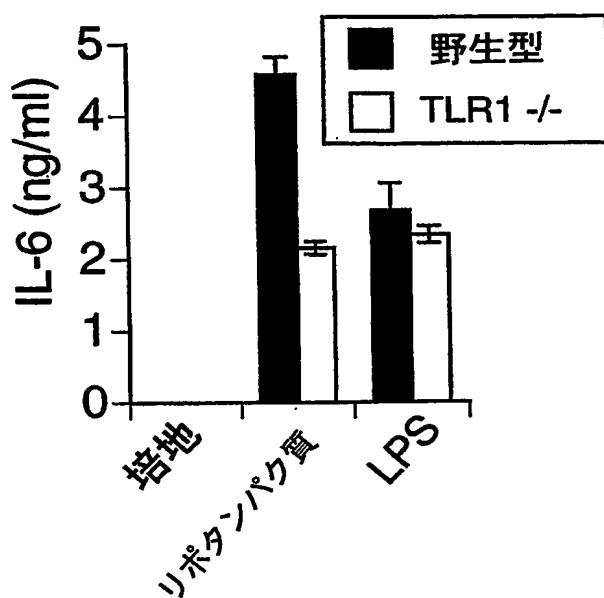
第 4 図



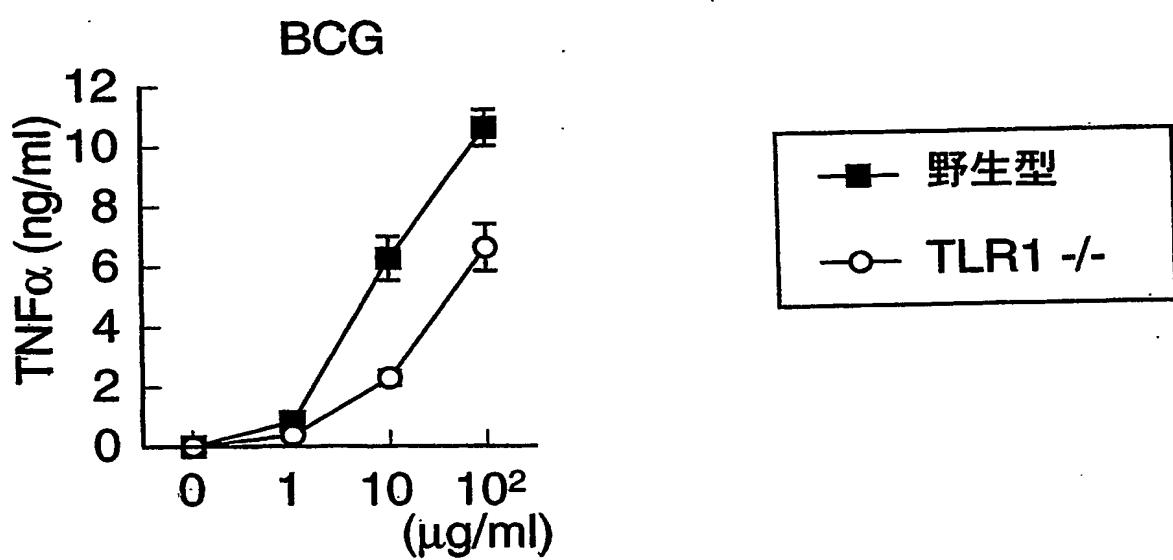
第 5 図



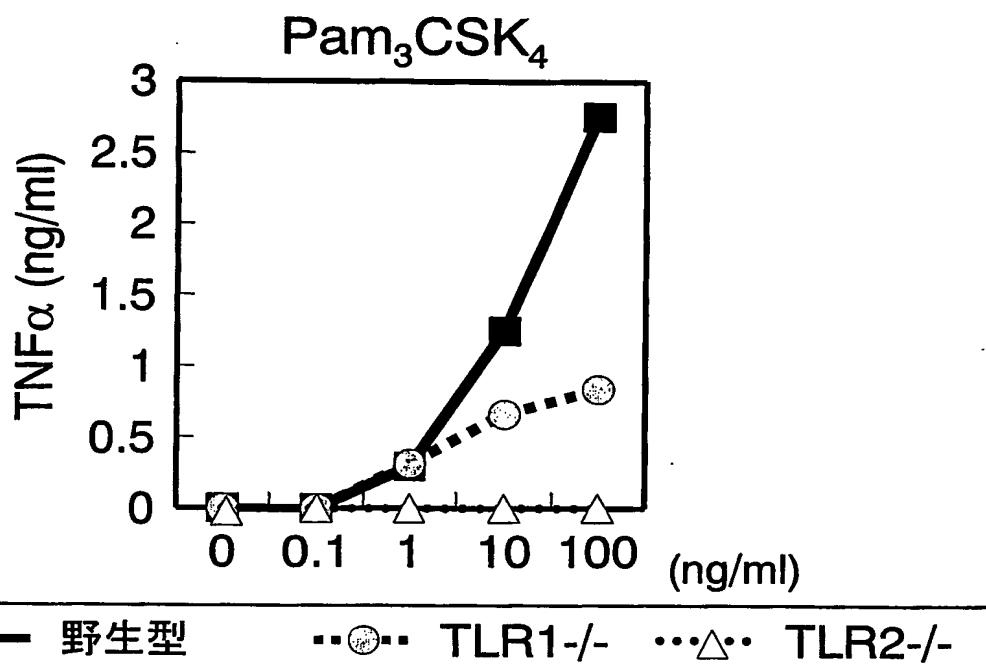
第 6 図



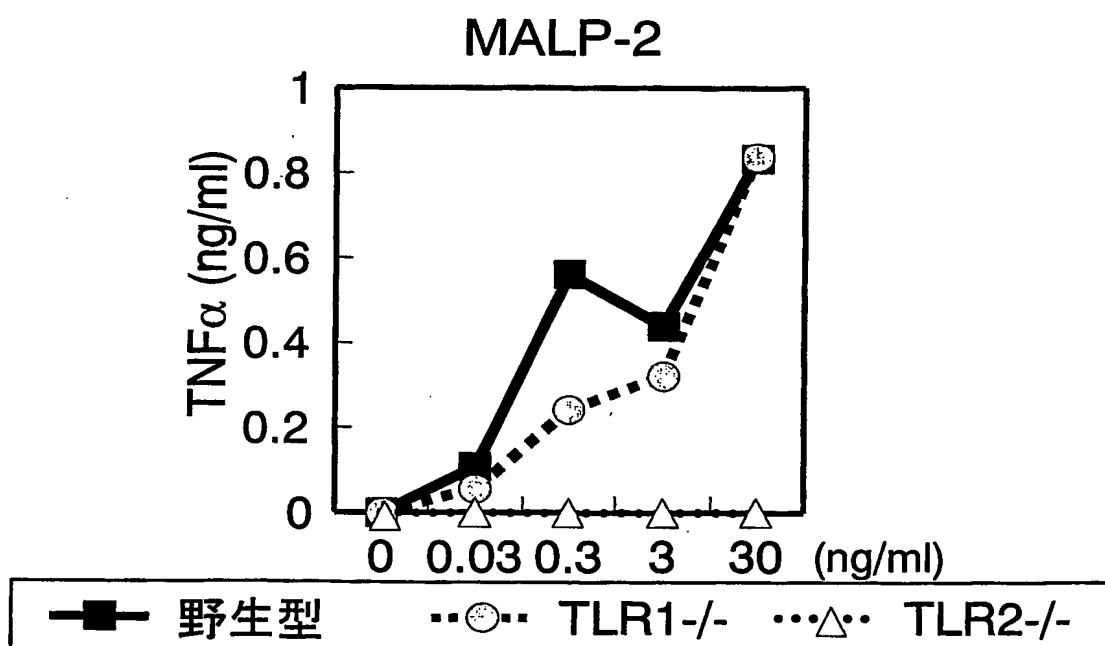
第 7 図



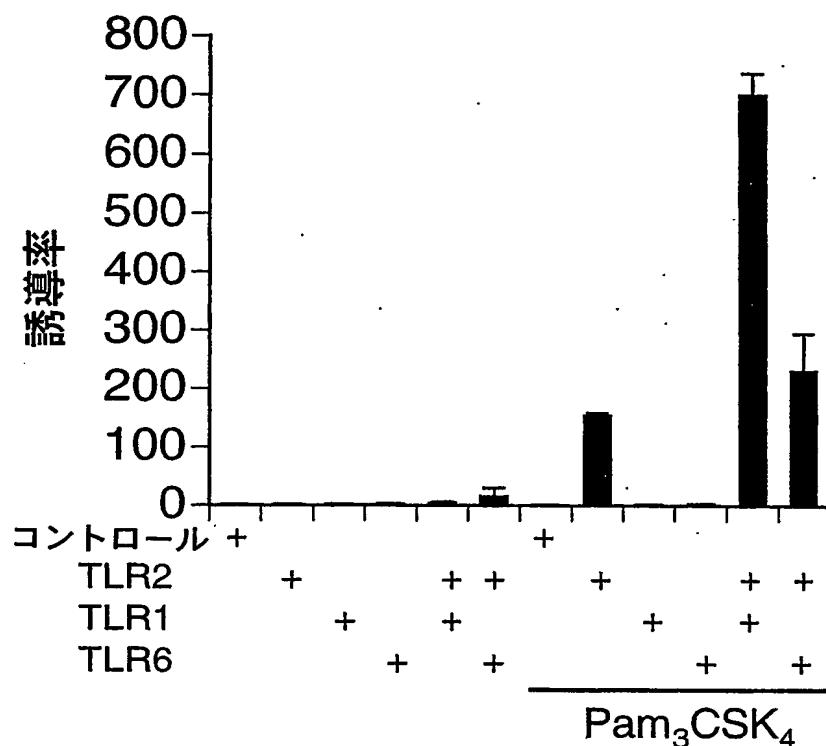
第 8 図



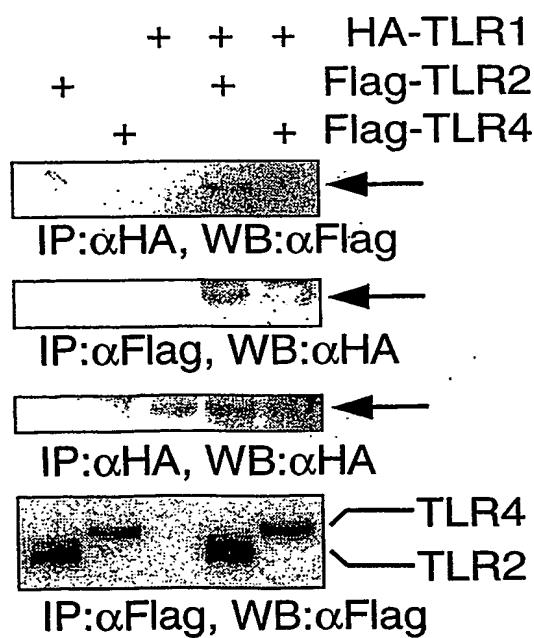
第 9 図



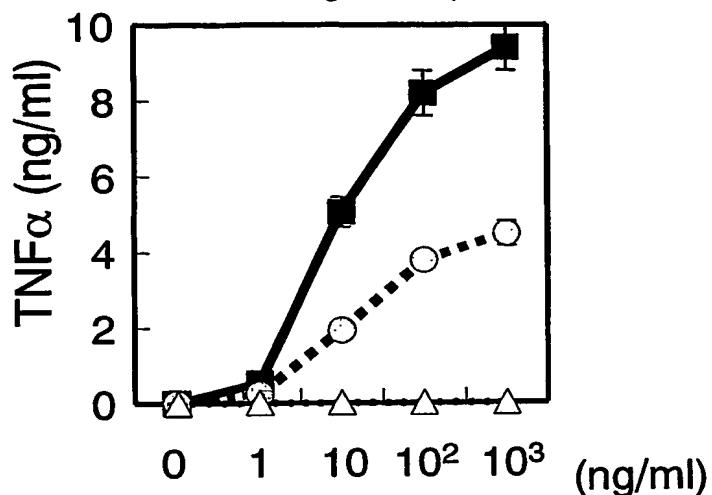
第 10 図



第 11 図

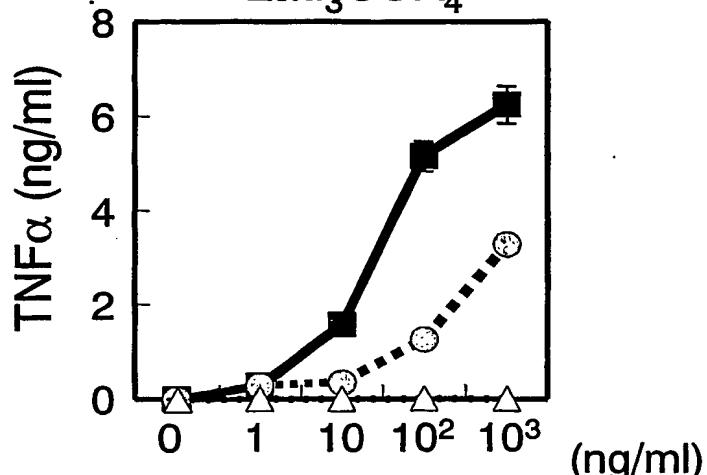


第 12 図

 $\text{Myr}_3\text{CSK}_4$ 

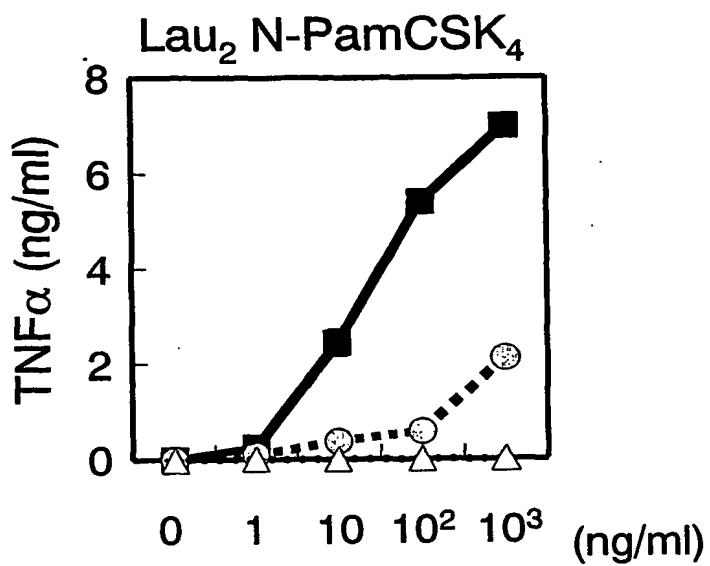
■ 野生型    ...○... TLR1 $^{-/-}$     ...△... TLR2 $^{-/-}$

第 13 図

 $\text{Lau}_3\text{CSK}_4$ 

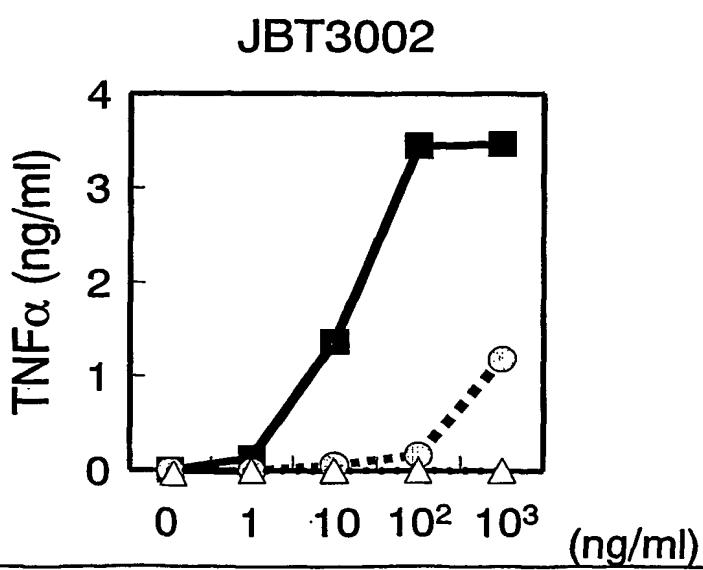
■ 野生型    ...○... TLR1 $^{-/-}$     ...△... TLR2 $^{-/-}$

第 14 図



■ 野生型    ⋯○⋯ TLR1<sup>-/-</sup>    ⋯△⋯ TLR2<sup>-/-</sup>

第 15 図



■ 野生型    ⋯○⋯ TLR1<sup>-/-</sup>    ⋯△⋯ TLR2<sup>-/-</sup>

## 特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 2002年12月09日 (09.12.2002) 月曜日 13時53分40秒

VIII-5-1	不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て(規則4.17(v)及び51の2.1(a)(v))	<b>本国際出願に關し、</b>  <b>科学技術振興事業団は、 本国際出願の請求項に記載された対象が以下のように に開示されたことを申し立てる。</b>
VIII-5-1 (i)	開示の種類	<b>その他: 学会</b>
VIII-5-1 (ii)	開示の日付:	<b>2001年12月13日 (13.12.2001)</b>
VIII-5-1 (iii)	開示の名称:	<b>第31回日本免疫学会総会・学術集会 (3-B-W 17-11-O/P)</b>
VIII-5-1 (iv)	開示の場所:	<b>大阪国際会議場</b>
VIII-5-1 (v)	本申立ては、次の指定国のため になされたものである。:	<b>すべての指定国</b>

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/12908

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A01K67/027, G01N33/50, G01N33/15, A61K45/00, A61P31/04,  
C12N15/09, C12Q1/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A01K67/027, G01N33/50, G01N33/15, A61K45/00, A61P31/04,  
C12N15/09, C12Q1/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2003
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2003	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2003

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
JOIS (JICST FILE), MEDLINE, BIOSIS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	TAKEUCHI et al., Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. Immunity, 01 July, 2002 (01.07.02), Vol.169, No.1, pages 10 to 14	1-13
P,X	ALEXOPOULOU et al., Hyporesponsiveness to vaccination with Borrelia burgdorferi OspA in humans and in TLR1- and TLR2-deficient mice. Nat. Med. 2002 Aug., Vol.8, No.8, pages 878 to 884	1-7
A	Osamu TAKEUCHI, "Toll-like receptor Knockout Mouse", Cell Technology, 22 April, 2000 (22.04.00), Vol.19, No.5, pages 767 to 774	1-6

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&"	document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		

Date of the actual completion of the international search 10 March, 2003 (10.03.03)	Date of mailing of the international search report 25 March, 2003 (25.03.03)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/12908

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	HAJJAR et al., Cutting edge: functional interactions between toll-like receptor (TLR) 2 and TLR1 or TLR6 in response to phenol-soluble modulin. J.Immunol. 01 January, 2001 (01.01.01), Vol.166, No.1, pages 15 to 19	1-6, 8-13 7
Y	JP 2002-45086 A (Japan Science and Technology Corp.), 12 February, 2002 (12.02.02), Full text; Figs. 1 to 5 & AU 75579901 A & WO 02/09508 A1	7
O,X	Osamu TAKEUCHI et al., "Dai 31 Kai Japanese Society for Immunology Sokai·Gakujutsu Shukai (Endai Bango: 3-B-W17-11-O/P)", Osaka Kokusai Kaigijo, 13 December, 2001 (13.12.01)	1-13

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP02/12908

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2.  Claims Nos.: 14-19

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

The inventions as set forth in the above claims do not disclose any specific substance but are specified merely by a screening method and an expected effect. Because of not being sufficiently supported by the description, these claims are not described to such (continued to extra sheet)

3.  Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest     The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
                       No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP02/12908

Continuation of Box No.I-2 of continuation of first sheet(1)

an extent that a person skilled in the art can easily effect the working thereof.

## A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. C1' A01K67/027, G01N33/50, G01N33/15, A61K45/00  
A61P31/04, C12N15/09, C12Q1/02

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. C1' A01K67/027, G01N33/50, G01N33/15, A61K45/00  
A61P31/04, C12N15/09, C12Q1/02

## 最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年  
日本国公開実用新案公報 1971-2003年  
日本国登録実用新案公報 1994-2003年  
日本国実用新案登録公報 1996-2003年

## 国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

JOIS (JICSTファイル)

MEDLINE

BIOSIS

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P X	TAKEUCHI et al. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. Immunity, 2002 Jul 1, Vol. 169, No. 1, pages 10-14	1-13
P X	ALEXOPOULOU et al. Hyporesponsiveness to vaccination with Borrelia burgdorferi OspA in humans and in TLR1- and TLR2-deficient mice. Nat Med. 2002 Aug, Vol. 8, No. 8, pages 87-884	1-7
A	竹内 理, Toll-like receptorノックアウトマウス, 細胞工学, 22 April 2000, Vol. 19, No. 5, pages 767 and 774	1-6

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

## 国際調査を完了した日

11.03.03

## 国際調査報告の発送日

25.03.03

## 国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

## 特許庁審査官(権限のある職員)

長井 啓子

2B 2914



電話番号 03-3581-1101 内線 3237

C (続き) . 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
X	HAJJAR et al. Cutting edge: functional interactions between toll-like receptor (TLR) 2 and TLR1 or TLR6 in response to phenol-soluble modulin. J Immunol. 2001 Jan 1, Vol. 166, No. 1, pages 15-19.	1-6, 8-13
Y	J P 2 0 0 2 - 4 5 0 8 6 A (科学技術振興事業団) 2 0 0 2 . 0 2 . 1 2 , 全文, 第1-5図 & AU 7 5 5 7 9 9 0 1 A & WO 0 2 / 0 9 5 0 8 A 1	7
OX	竹内 理等. 第31回日本免疫学会総会・学術集会(演題番号: 3-B-W17-11-O/P) 大阪国際会議場, 2001. 12. 13	1-13

## 第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、
2.  請求の範囲 14-19 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、  
上記の請求の範囲に係る発明は、スクリーニング方法及び期待される作用によって、特定されているだけで、具体的にどのような物質であるかが明確でない。また、明細書による十分な裏付けを欠いており、実施可能な程度に記載されていない。
3.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。